

用指示植物分离鉴定马铃薯轻花叶病毒 (PVX) 的技术

吴凌娟, 张雅奎, 董传民, 徐学谱, 李功轶

(大兴安岭地区农业科学研究所, 加格达奇 165000)

摘要: 试验研究指示植物培养、接种鉴定及分离马铃薯轻花叶病毒 (PVX) 的方法, 为马铃薯轻花叶病毒抗血清制备提供技术保证。

关键词: 指示植物; 病毒鉴定; 病毒分离

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1672-3635 (2003) 02-082-02

1 前言

马铃薯轻花叶病毒 (PVX) 是造成马铃薯病毒性退化的主要病毒之一, 这种病毒引起的病毒病在马铃薯各个品种之间分布广泛。虽然此病毒单一侵染时症状比较温和, 但当马铃薯轻花叶病毒 (PVX) 和重花叶病毒 (PVY) 等复合侵染时, 却能给生产造成严重损失, 尤其是这种病毒的症状在过高过低温度和大水大肥条件下极易隐蔽, 成为马铃薯生产及育种工作的潜在危险^[1]。

鉴定马铃薯病毒有先进电镜技术、酶联免疫吸附技术、单克隆抗体技术等, 提高了病毒鉴定的灵敏度。但指示植物仍然是鉴定马铃薯病毒、分离马铃薯病毒的基本手段^[2], 为马铃薯病毒抗血清制备提供技术保证。

2 材料与方法

2.1 材料

指示植物有千日红 (*Gomphrena globosa* L)、白花刺果曼陀萝 (*Datura stramonium*)、光曼陀萝 (*Datura metel*)、指尖椒 (*Capsicum annum*)、普通烟 (*Nicotiana tabacum* L)、黄苗榆 (*Nicotiana samsun*)、心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*)、灰条藜 (*enopodium album*)、苋色藜 (*Chenopodium*

amaranticolor)。马铃薯病株、塑料花盆、600目金刚砂、pH 7.2 磷酸缓冲液、病毒检测试剂盒等。

2.2 方法

2.2.1 指示植物培养

指示植物播种在防虫温室花盆中, 土壤选山上草炭土。为了接种时所有指示植物的苗龄具有 3~4 片真叶, 排开时间播种, 千日红、普通烟、黄苗榆、心叶烟发育慢, 这就要比指尖椒早 7~10 d 播种, 而白花刺果曼陀萝、光曼陀萝、苋色藜、灰条藜发育较快, 比千日红晚播 15~20 d。温室温度不低于 18~20℃, 必须严防昆虫, 常开的门窗要钉上纱布, 每隔 3~5 d 要喷洒一次杀虫剂。

2.2.2 指示植物的摆组

用指示植物鉴定、分离马铃薯 X 病毒, 必须进行摆组鉴定, 有重复性, 以便确定带哪几种病毒。接种前, 指示植物进行摆组, 将系统侵染摆 4 盆, 局部侵染摆 2 盆, 各种指示植物不能相互接触, 以免影响鉴定结果。

2.2.3 指示植物接种

马铃薯轻花叶病毒 (PVX) 是以摩擦接种方式进行传毒的。接种前 2~3 d, 指示植物放在散射光和凉爽地方, 在待接种的寄主植物叶片上, 均匀喷洒 600 目金刚砂, 然后用已消毒的棉球蘸被鉴定的马铃薯叶汁 (稍加 pH 7.2 磷酸缓冲液, 按汁液量 1/2 加入), 沿叶脉按顺序轻轻摩擦, 在接种叶下面, 垫以用蒸汽消毒过的硬纸片, 用力程度以接种及叶片表面无明显严重损伤为度。接种后, 用自来

收稿日期: 2003-03-01

作者简介: 吴凌娟 (1965-), 女, 高级农艺师, 从事马铃薯脱毒技术研究

水轻轻冲洗接叶表面上的杂物, 置防虫温室培养, 待 2~3 d 后逐日观察症状反应。

2.2.4 指示植物鉴定

根据鉴别寄主反应的典型症状来识别致病毒源, 马铃薯 X 病毒在主要鉴别寄主上发病的典型症状为: 千日红接种 5~6 d, 在接种叶片上产生紫红色环枯斑, 环斑中心为灰白色。白花刺果曼陀萝, 接种 10 d 后, 接种叶片有时出现小坏死斑点, 以后发展为系统花叶。光曼陀萝, 接种 10 d 左右, 心叶出现淡褐色坏死斑。指尖椒, 接种 10~12 d, 接种叶片出现褐色坏死斑。灰条藜, 接种 7~10 d, 接种叶片产生圆形小枯死斑。苋色藜, 接种 10 d 左右, 接种叶片出现失绿斑点。普通烟、心叶烟及黄苗榆接种 20 d 后, 所有叶片呈现花叶。

2.2.5 马铃薯 X 病毒用过滤寄主排除法分毒

用一皱缩花叶症状克新 4 植株, 先摩擦接种于白花刺果曼陀萝上 (*Datura stramonium*), 可能表现脉间失绿花叶症状, 这一症状是 PVX 的反应, 说明毒源中有 PVX。白花刺果曼陀萝对 PVY 免疫, 这一次接种排除了 PVY, 摩擦接种法不传播 PLRV, 又排除 PLRV, 再取接种的白花刺果曼陀萝的叶片, 作为接种体, 取下一点叶, 加进一些 pH 7.2 磷酸缓冲液 (按重量比是 1:5) 在小研钵中研碎, 接种于尖椒上 (*Capsicum annuum*), 尖椒应表现花叶并具有坏死斑等症状, 尖椒对 PVS、PVM、PVA 免疫, 又排除三种病毒, 再用血清学方法检测带毒状况, 接种于普通烟 (*Nicotiana tabacum*) 上繁殖。

2.2.6 马铃薯 X 病毒用单斑分离法分毒

用一皱缩花叶症状克新 4 号植株, 用摩擦接种法接种于千日红上, 表现局部病斑症状后用灭过菌的小剪刀, 把病斑剪下 (尽量少带绿色叶肉), 加一点磷酸缓冲液, 用研钵棒把接种体摩擦接种于另一株千日红叶片上 (可同时以数个单斑接种于另一株千日红上), 等表现出 PVX 的局部病斑症状后, 再分别剪下这些病斑, 摩擦接种于白花刺果曼陀萝上, 排除可能存在 PVY, 等白花刺果曼陀萝表现出脉间失绿, 花叶症状之后, 再用血清学检测, 接种普通烟上繁殖病毒。

2.2.7 用血清学检验两种方法分毒情况

用国际马铃薯中心试剂盒, 酶结合物为碱性磷酸酶 (AP) 标记四种抗体 PVX、PVY、PVS、

PLRV, 阴性为未接种曼陀萝叶, 阳性为已保存毒源, 检测样品为过滤寄主排除法、单斑分离法分毒曼陀萝的病叶。健康叶、病叶在提取缓冲液中稀释 10 倍, 按 ELISA 法操作程序, 在 96 孔聚乙烯板上进行方阵滴定。根据样品孔颜色变化判定带毒情况, 显黄色为阳性, 微黄色或不显色为阴性。

3 结果与讨论

3.1 用指示植物鉴定马铃薯 X 病毒

多种指示植物可以鉴定马铃薯 X 病毒, 但以局部侵染方式的指示植物可直观看到枯斑症状, 有千日红、指尖椒、灰条藜、苋色藜等。千日红发病时间短, 易观察, 是一种很好的鉴定指示植物。

3.2 用血清学检测两种方法分毒情况

采用 ELISA 方法, 对过滤寄主排除法、单斑分离法分毒的曼陀萝病叶进行检测, 结果是未接种曼陀萝叶的孔显微黄色, 为阴性 (-), 两种分离法曼陀萝的病叶, 在 PVX 孔, 显现黄色, 为阳性 (+), 在 PVY、PVS、PLRV 孔, 呈现微黄色, 为阴性 (-), 说明曼陀萝病叶只含有 PVX 病毒, 不含有其它病毒。这两种分离马铃薯 X 病毒的技术, 在实践上是可行的。

3.3 指示植物培养

指示植物管理要规范化, 定期喷洒杀虫剂, 浇水时切忌干湿不均; 摆组时, 各指示植物不能相互接触; 室内培养的病毒, 要保持隔离, 防止病毒感染; 所接种用的指示植物苗龄一致, 应排开时间, 分批播种, 控制温室温度, 有利于寄主症状表现。

参 考 文 献

- [1] 德波克瑟斯 J A. 马铃薯病毒和种薯生产. 北京: 农业出版社出版, 1981, 135—138.
- [2] Salazar Luis F. 马铃薯病毒及其防治. 北京: 中国农业科技出版社, 2000, 83—111.

消 息

▲天津顶峰淀粉开发公司正式申请团体入会, 截止 2003 年 3 月马铃薯专业委员会已发展团体会员单位 36 个。

▲原订于 4 月份召开的 2003 年中国马铃薯学术年会及第五届世界马铃薯大会延期召开, 论文集的出版亦顺延。本刊通讯员